

Title	Regulation of Xenopus Cdt1 in preventing DNA re-replication
Author(s)	吉田, 和真
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46507">https://hdl.handle.net/11094/46507</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	吉 田 和 真
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 20040 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Regulation of <i>Xenopus</i> Cdt1 in preventing DNA re-replication (DNA 再複製阻止におけるアフリカツメガエル Cdt1 の厳密な制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 滝澤 温彦 (副査) 教 授 田嶋 正二    教 授 平岡 泰    教 授 升方 久夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核生物の染色体 DNA は一回の細胞周期で過不足なく一度だけ複製される。M 期終期から G1 期にかけて染色体が複製可能な状態となる事は「複製のライセンス化」と呼ばれ、これは ORC (origin recognition complex) と Cdc6、Cdt1 に依存して MCM (mini-chromosome maintenance) ヘリカーゼが染色体上に結合する事を示す。S 期に複製後の染色体から MCM が解離する一方で、次の細胞周期に入るまでライセンス化が阻害されていることにより、同一周期内での染色体の再複製は回避されている。酵母では主に CDK (cyclin-dependent kinase) の働きによって S 期以降の MCM の染色体結合が阻害されている。一方、多細胞生物では CDK に加えて、MCM の染色体結合に必要な Cdt1 を阻害する因子 *geminin* が存在している。酵母には相同蛋白質が存在しないことから、*geminin* は多細胞生物に特異的な再複製阻止機構に貢献していると考えられる。本研究ではアフリカツメガエル卵無細胞複製系を用いた解析から、Cdt1 の制御が再複製阻止における要であり、その為に *geminin* が必須の役割を果たしている事を明らかにした。

#### 1. 再複製阻止における Cdt1 の制御

細胞周期を間期に停止させた卵抽出液に精子核 DNA を加えると、核形成後に DNA 複製が一回のみ起きる。DNA 複製時のライセンス化因子の蛋白質量を解析した結果、Cdt1 が複製開始とともにプロテアソームにより分解されることを見出した。そこで、大腸菌で発現・精製した組換え Cdt1 を卵抽出液に加え、その影響を解析した。その結果、組換え Cdt1 添加により DNA 複製後の染色体に MCM が再結合し、再複製が引き起こされることが分かった。

次に、Cdt1 阻害因子 *geminin* に対する抗体を作成し、卵抽出液から *geminin* を免疫除去した。その結果 *geminin* 非存在下では組換え Cdt1 による再複製が促進され、さらには組換え Cdt1 を加えなくても僅かであるが再複製が起きる事が分かった。卵抽出液中では *geminin* による Cdt1 阻害が再複製阻止において必須であると示唆される。加えて、プロテアソーム阻害により Cdt1 を安定化すると、組換え Cdt1 の添加あるいは *geminin* 除去による再複製が促進されたので、Cdt1 分解もまた再複製阻止の重要な一機構であると考えられる。

#### 2. 過剰な Cdt1 による DNA 複製の進行阻害

卵抽出液中での DNA 複製の進行を解析した結果、組換え Cdt1 を添加すると再複製が起きるのに加えて、一度目の DNA 複製の進行が遅れている事を見出した。そこで、複製関連タンパク質の染色体結合を解析した結果、複製開始が遅れている事が示された。さらに、複製開始後に組換え Cdt1 を加えた解析から、伸長反応も抑制されている事が分かった。

複製反応の抑制には複製チェックポイント経路が関与している可能性がある。そこで、組換え Cdt1 存在下でチェックポイントキナーゼ Chk1 のリン酸化状態を調べたところ、チェックポイント経路が活性化していることが分かった。しかし、阻害剤によりチェックポイント経路を阻害しても、組換え Cdt1 による DNA 複製の遅延は見られた。また、Chk1 のリン酸化は複製開始に依存していたが、組換え geminin の添加により再複製のみを阻害した場合に Chk1 はリン酸化されたので、再複製の結果チェックポイント経路が活性化されているのではないと考えられる。以上より、過剰な Cdt1 によって DNA 複製が遅延し、それがチェックポイント経路を活性化していると推測される。

これらの結果から、Cdt1 の制御は再複製を阻止するだけでなく、DNA 複製の正常な進行自体にも必要である事が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

真核細胞の染色体 DNA が一回の細胞周期で過不足なく一度だけ複製される事を保証する複製のライセンス化機構において Cdt1 タンパク質は中心的な役割しているが、その機能には不明な点が多い。吉田和真君はアフリカツメガエル卵無細胞系を用いて、Cdt1 タンパク質の新たな機能を発見し、またその機能制御が正確な DNA 複製において非常に重要である事を明らかにした。第一には、Cdt1 の制御が再複製阻止に必須であることを見出したことである。すなわち、卵無細胞系に過剰な Cdt1 を加える事により染色体 DNA が再複製されること、Cdt1 は複製開始とともにプロテアソームにより分解され、その分解を阻害すると再複製の効率が上昇すること、Cdt1 阻害因子 geminin が再複製の阻止において必須な役割を果たしている事を発見した。第二には、Cdt1 の厳密な制御が正常な複製進行に必要であることを見出したことである。すなわち、過剰な Cdt1 が再複製を起こすばかりでなく複製チェックポイントを活性化し、また DNA 複製の進行を阻害すること、しかし進行の阻害にチェックポイントは関わっていないことを明らかにした。さらにチェックポイントの活性化には複製開始は必要であるが、再複製は関わっておらず、複製の遅延が関わっていることを示す結果を得た。以上の結果は、Cdt1 の制御が再複製を阻止するだけでなく、DNA 複製の正常な進行自体にも必要である事を初めて示したものであり、Cdt1 の機能を解明する上で重要な貢献をしている。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。